

**PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI  
 $\beta$ -GALAKTOSIDASE *Lactobacillus plantarum* B123 INDIGENOS  
DAN HIDROLISIS LAKTOSA UNTUK PRODUKSI  
SUSU *ULTRA HIGH TEMPERATURE* RENDAH LAKTOSA**

***PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION  $\beta$ -GALACTOSIDASE  
*Lactobacillus plantarum* B123 INDIGENOS AND LACTOSE HYDROLISIS TO  
PRODUCE LOW LACTOSE *ULTRA HIGH TEMPERATURE* MILK***

**Tatik Khusniati<sup>1</sup>, Neny Mariyani<sup>2</sup>, Hanifah Nuryani Lioe<sup>2</sup>, Didah Nur Faridah<sup>2</sup>, Abdul Choliq<sup>1</sup>  
Dan Sulistiani<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi,  
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

<sup>2</sup>Departemen Teknologi Pangan, FATETA, Universitas Pertanian Bogor  
Email: [tatikkhusni@yahoo.com](mailto:tatikkhusni@yahoo.com)

Diterima : 08 September 2015, Revisi : 22 Oktober 2015, Disetujui : 14 Nopember 2015

**ABSTRAK**

$\beta$ -Galaktosidase merupakan enzim penghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Enzim ini digunakan dalam produksi susu rendah laktosa untuk konsumsi penderita intoleransi laktosa. Purifikasi parsial  $\beta$ -galaktosidase penting dilakukan untuk meningkatkan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase sehingga potensi hidrolisanya pada laktosa susu *Ultra High Temperature* meningkat. Penelitian ini bertujuan untuk produksi dengan purifikasi parsial dan karakterisasi  $\beta$ -galaktosidase *Lactobacillus plantarum* B123 indigenos dan hidrolisis laktosa untuk produksi susu *UHT* rendah laktosa. Purifikasi parsial dilakukan dengan pengendapan yang diikuti dialisis. Karakterisasi meliputi optimasi dan stabilitas enzim, sedangkan hidrolisis laktosa untuk produksi susu *UHT* rendah laktosa dideteksi menggunakan kit enzimatis GOD-POD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi  $\beta$ -galaktosidase dengan purifikasi parsial mengalami peningkatan dari  $21.51 \pm 0.23$  U/mL (kasar) menjadi  $106.34 \pm 0.56$  U/mL (dialisis). Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar optimum tercapai pada pengendapan amonium sulfat dengan konsentrasi 60 %. Kemurnian  $\beta$ -galaktosidase kasar meningkat sebesar 3.71 kali setelah pengendapan, dan 14.28 kali setelah dialisis. Karakterisasi  $\beta$ -galaktosidase menunjukkan bahwa aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar dan hasil dialisis optimum dicapai masing-masing pada pH 6.5 dan suhu 50 °C. Stabilitas  $\beta$ -galaktosidase kasar yang diinkubasi selama 1 jam terjadi pada pH 5.0-8.5 dan suhu 25-50 °C. Aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase kasar adalah 15.05 U/mg protein, sedangkan  $\beta$ -galaktosidase hasil dialisis adalah 109.58 U/mg

protein. Hidrolisis laktosa untuk produksi susu *UHT* rendah laktosa menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa meningkat dengan meningkatnya waktu hidrolisis. Waktu yang diperlukan untuk menghidrolisa 50 % laktosa susu *UHT* dengan 4.8 U/mL  $\beta$ -galaktosidase pada suhu 50 °C adalah 6.08 jam. Disimpulkan bahwa  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 indigenos yang dipurifikasi secara parsial dapat digunakan sebagai penghidrolisa laktosa dalam produksi susu *UHT* rendah laktosa.

**Kata kunci:**  $\beta$ -galaktosidase, *Lactobacillus plantarum* B123 indigenos, purifikasi, hidrolisis laktosa, susu *UHT*

**ABSTRACT**

$\beta$ -Galactosidase is enzyme which hydrolyze lactose to glucose and galactose. This enzyme is used in production low lactose milk for consumption human which have lactose intolerance. Partial purification of  $\beta$ -galactosidase is important to be conducted to increase  $\beta$ -galactosidase activity in order to its hydrolysis potency on *UHT* milk lactose increased. This research was aimed to production by partially purification and characterization indigenous  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* B123, and lactose hydrolysis for production low lactose *UHT* milk. Partially purification were precipitation following dialysis. Characterization included optimization and stabilization of enzyme, while lactose hydrolysis for production low lactose *UHT* milk was detected by enzymatic GOD-POD kit. The results showed that production of  $\beta$ -galactosidase by using partial purification increased from  $21.51 \pm 0.23$  U/mL (crude) to  $106.34 \pm 0.56$  U/mL (dialysis). The optimum crude  $\beta$ -galactosidase activity was

reached in precipitation by using 60 % ammonium sulphate. The purity of crude  $\beta$ -galactosidase increased 3.71 times after precipitation, and 14.28 times after dialysis. Characterization of  $\beta$ -galactosidase showed that optimum activities of crude and dialyzed  $\beta$ -galactosidase were at pH 6.5 and 50 °C, respectively. Stability of crude  $\beta$ -galactosidase incubated for 1 h were at pH: 5.0-8.5 and 25-50 °C. Specific activity of crude  $\beta$ -galactosidase was 15.05 U/mg protein, while that dialyzed  $\beta$ -galactosidase was 109.58 U/mg protein. Lactose hidrolisis to produce low lactose UHT milk showed that glucose concentration increased with the increase of hidrolisis time. Time needed to hidrolize lactose 50 % with 4.8 U/mL  $\beta$ -galactosidase at 50 °C was 6.08 h. In conclusion that indigenous  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* B123 purified partially can be used as lactose hidrolizer in production of low lactose UHT milk.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidase, indigenous *Lactobacillus plantarum* B123, purification, lactose hidrolisis, UHT Milk

## PENDAHULUAN

Enzim yang mempunyai peranan penting dalam menghidrolisa laktosa menjadi glukosa dan galaktosa adalah  $\beta$ -galaktosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC:3.2.1.23)<sup>(1,2)</sup>. Enzim  $\beta$ -galaktosidase ini sering dikenal sebagai laktase, dan enzim ini potensial dikembangkan di industri pangan,<sup>(3)</sup> terutama di industri susu, yaitu untuk produksi susu rendah/bebas laktosa.<sup>(4)</sup>

Berbagai jenis bakteri terutama bakteri asam laktat (BAL) dapat menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase, diantaranya *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* dan *Lactococcus lactis*.<sup>(5)</sup> Bakteri asam laktat secara umum termasuk bakteri GRAS (Generally Recognized as Safe), sehingga penggunaan  $\beta$ -galaktosidase dari BAL dapat digunakan langsung dalam produk pangan dikarenakan BAL bersifat aman dan tidak toksik.<sup>(1,6)</sup>

Purifikasi parsial  $\beta$ -galaktosidase penting dilakukan untuk meningkatkan

aktivitas  $\beta$ -galaktosidase agar supaya kegunaannya dalam hidrolisis laktosa susu semakin meningkat<sup>(7-10)</sup>. Produksi  $\beta$ -galaktosidase dari beberapa bakteri menunjukkan bahwa jenis bakteri penghasil  $\beta$ -galaktosidase dan jenis purifikasi yang berbeda mempunyai aktivitas  $\beta$ -galaktosidase yang berbeda<sup>(7,11)</sup>. Enzim  $\beta$ -galaktosidase kasar yang diekstraksi dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12) menghasilkan aktivitas sebesar 20.9 U/ml,<sup>(7)</sup> sedangkan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase dari *Thermotoga maritima* hasil purifikasi menggunakan kromatografi gel filtrasi menghasilkan aktivitas sebesar 185 U/mg.<sup>(8)</sup>

Enzim  $\beta$ -galaktosidase dapat dihasilkan oleh BAL.<sup>(7,10,11)</sup> *Lactobacillus plantarum* sebagai salah satu BAL penghasil  $\beta$ -galaktosidase sudah dilaporkan.<sup>(12)</sup> Karakter  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* menunjukkan bahwa pH optimum  $\beta$ -galaktosidase dari *Lactobacillus plantarum* WCFS1 dengan substrat oNPG adalah 7.5 dengan suhu optimum 55 °C.<sup>(12)</sup> Meskipun demikian, karakter  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 indigenos dan hidrolisis laktosa untuk produksi susu UHT rendah laktosa belum diteliti. Proses hidrolisis laktosa dalam produksi susu UHT rendah laktosa penting karena laktosa susu UHT dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa yang lebih mudah diserap oleh usus manusia untuk konsumsi penderita intoleransi laktosa. Persentase laktosa terhidrolisis bervariasi dan dipengaruhi oleh jenis susu dan mikroba penghasil  $\beta$ -galaktosidase, konsentrasi  $\beta$ -galaktosidase, suhu dan waktu hidrolisis. Persentase laktosa terhidrolisis pada susu pasteurisasi oleh  $\beta$ -galaktosidase *Thermotoga maritima* dengan konsentrasi 4 U/mL pada suhu 80 °C dengan waktu hidrolisis 3 jam adalah 100 %, <sup>(13)</sup> sedangkan persentase laktosa terhidrolisis pada susu skim oleh  $\beta$ -galaktosidase *Kluyveromyces lactis*,

GODO-YNL2 (komersial) dengan konsentrasi 60 U/mL pada suhu 8 °C dengan waktu hidrolisis 24 jam adalah 99.9 %.<sup>(14)</sup> Persentase laktosa terhidrolisis pada susu pasteurisasi oleh  $\beta$ -galaktosidase *Lb. ssp. bulgaricus* (CHR Hansen Lb-12) dengan konsentrasi 0,418 U/mL pada suhu 52 °C dengan waktu hidrolisis 6 jam adalah 78 %, <sup>(7)</sup> sedangkan presentase laktosa terhidrolisis pada susu UHT oleh  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* belum dilaporkan. Penelitian ini difokuskan pada produksi dengan purifikasi parsial dan karakterisasi  $\beta$ -galaktosidase *Lactobacillus plantarum* B123 indigenos dan hidrolisis laktosa untuk produksi susu UHT rendah laktosa.

## BAHAN DAN METODA BAHAN

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat *L. plantarum* B123 indigenos dari makanan fermentasi sayuran, merupakan kultur yang diidentifikasi secara molekuler, koleksi Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI; dan media MRSB (*de Mann Rogosa Sharpe Broth*).<sup>(15)</sup>

### Metode

#### *Produksi $\beta$ -Galaktosidase *L. plantarum* B123 dengan Purifikasi Parsial*

Produksi  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 dilakukan dengan purifikasi parsial, dengan tahap awal adalah ekstraksi enzim, kemudian dilanjutkan pengendapan dengan amonium sulfat dan dialisis menggunakan membran dialisis.

#### *Ekstraksi $\beta$ -Galaktosidase *L. plantarum* B123 dengan Metoda Wang and Sakakibara (1997)<sup>(16)</sup>*

Sebanyak 2 % inokulum *L. plantarum* B123 dengan OD 0.7 ( $5.00 \times 10^7$  cfu/mL)

diinokulasikan kedalam media produksi yang sudah disterilisasi (MRSB dengan kandungan laktosa 1 % dan pH medium : 8), dan diinkubasi pada suhu 37 °C. Sel dipanen sesudah waktu inkubasi selama 24 jam. Cairan kemudian disentrifus dengan 9500 rpm ( $14330 \times g$ ) selama 15 menit pada 4 °C. Pelet dicuci dua kali dengan bufer fosfat 0.05 M pH 6.5. Pelet yang didapat dilarutkan dalam bufer fosfat 0.05 M pH 6.5 dan sel dipecah dengan sonikator 50 kHz selama 15 menit pada 4 °C. Suspensi sel kemudian disentrifus dengan kecepatan 9500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim kasar  $\beta$ -galaktosidase. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase diukur dengan metoda Lu *et al.*, 2012 <sup>(17)</sup> dan konsentrasi protein dideteksi dengan metoda Bradford.<sup>(18)</sup>

#### *Pengendapan Menggunakan Amonium Sulfat dengan Metoda Scopes (1993)<sup>(19)</sup>*

Enzim diendapkan untuk determinasi fraksi pengendapan dengan aktivitas spesifik optimum. Enzim  $\beta$ -galaktosidase kasar ditambahkan amonium sulfat sampai konsentrasi 10 % dengan pengadukan 60 rpm pada suhu 4 °C. Sesudah semua amonium sulfat dilarutkan, pengadukan dilanjutkan selama 20 menit. Campuran kemudian didiamkan selama 1 jam pada 4 °C dan disentrifus dengan 9500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh kemudian ditambah kembali amonium sulfat seperti prosedur diatas untuk fraksi pengendapan 20, 30, 40, 50, 60 dan 70 %. Endapan enzim dipisahkan dan dilarutkan dalam bufer fosfat 0.05 M pH 6.5, kemudian disentrifus kembali dengan 9500 rpm selama 15 menit pada 4 °C. Supernatan masing-masing fraksi pengendapan kemudian diukur aktivitas  $\beta$ -galaktosidase dengan metoda Lu *et al.*, 2012<sup>(17)</sup> dan konsentrasi protein dengan metoda Bradford.<sup>(18)</sup> Fraksi pengendapan yang menghasilkan aktivitas spesifik

optimum adalah 60 %, sehingga untuk enzim kasar diendapkan pada konsentrasi 60 %.

Jumlah amonium sulfat (dalam gram) yang digunakan untuk melarutkan 1 liter larutan enzim ditunjukkan dalam persamaan (1). S1 adalah konsentrasi awal amonium sulfat, sedangkan S2 adalah konsentrasi akhir amonium sulfat. Nilai 533 adalah jumlah gram amonium sulfat yang diperlukan per liter larutan untuk membuat 100% larutan jenuh.

$$\text{Jumlah amonium sulfat (g/L)} = \frac{533 (S2-S1)}{100-0.3S2} \quad (1)$$

#### *Dialisis dengan Metoda Jurado et al (2002)<sup>(6)</sup>*

Larutan enzim yang dihasilkan dari pengendapan dengan amonium sulfat didialisis menggunakan bufer fosfat 0.01 M pH 6.5 dengan 100 rpm. Enzim didialisis pada suhu 4 °C selama 24 jam dengan membran dialisis selofan. Aktivitas spesifik dan konsentrasi protein  $\beta$ -galaktosidase hasil dialisis diukur kembali.  $\beta$ -Galaktosidase hasil dialisis disimpan pada suhu 4 °C.

#### **Aktivitas dan stabilitas $\beta$ -galaktosidase**

Aktivitas dan stabilitas  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 dilakukan diberbagai pH dan suhu. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase diuji dengan metoda Lu et al. 2009 yang dimodifikasi,<sup>(17)</sup> dan stabilitas  $\beta$ -galaktosidase dilakukan selama penyimpanan 1 jam pada suhu 37 °C.

#### *Aktivitas $\beta$ -Galaktosidase dengan Metoda Lu et al. (2009)<sup>(17)</sup>*

Sebanyak 1000  $\mu$ L bufer fosfat 0.1 M pH 7 dan 100  $\mu$ L enzim dituang kedalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Larutan kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L *o*NPG 2

mg/mL dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Pada menit ke-10 larutan ditambahkan 1000  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M untuk menghentikan reaksi. Larutan dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis pada  $\lambda$  420 nm.

Kurva standar yang dilakukan di berbagai konsentrasi *o*NP dari 0-2.500 mM dilarutkan dalam buffer fosfat 0.01 M pH 7. Sejumlah 1000  $\mu$ L bufer fosfat 0.1 M pH 7 dan 100  $\mu$ L aquades dituang kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L *o*NP diberbagai konsentrasi. Larutan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 5 menit. Kemudian, larutan ditambahkan 1000  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Larutan di-vortex dan intensitas warna kuning diukur absorbannya pada  $\lambda$  420 nm. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase diplot dengan hasil kurve standar. Satu unit aktivitas  $\beta$ -galaktosidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1  $\mu$ mol *o*NP dari substrat *o*NPG per menit pada kondisi perlakuan. Aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase diplot dengan hasil kurva standar protein. Kurva standar protein dibuat dengan *bovine serum albumin* (BSA), dengan berbagai konsentrasi dari 0.00-0.60 mg/mL. Sejumlah 20  $\mu$ L  $\beta$ -galaktosidase ditambah 1 mL reagen Bradford.<sup>(18)</sup> Larutan di vortex dan didiamkan selama 5 menit, kemudian diukur absorbannya pada  $\lambda$  595 nm.

#### *Aktivitas $\beta$ -Galaktosidase pada Berbagai pH dan Suhu*

Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase di-berbagai pH diukur dengan cara: sejumlah 100  $\mu$ L enzim kasar dituang kedalam 1 mL bufer 0.1 M dengan variasi pH antara pH 4.5–8.5 (pH interval : 0.5), sedangkan aktivitas di-berbagai suhu diukur dengan cara: sejumlah 100  $\mu$ L enzim kasar dituang kedalam 1 mL bufer 0.1 M pH optimum, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada masing-masing suhu (25-60 °C dengan interval: 5 °C). Kemudian aktivitas  $\beta$ -galaktosidase

diukur dengan metoda Lu *et al.*, 2012.<sup>17</sup> Aktivitas enzim kemudian didefinisikan sebagai aktivitas relatif (%), yaitu aktivitas pada pH atau suhu tertentu (U/mL) dibagi aktivitas tertinggi (U/mL) x 100 %. Masing-masing nilai pH dan suhu yang memberikan aktivitas relatif tertinggi menunjukkan masing-masing pH dan suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase.

#### *Stabilitas $\beta$ -Galaktosidase Diberbagai pH dan Suhu*

Stabilitas  $\beta$ -galaktosidase di berbagai pH diuji dengan cara: sejumlah 50  $\mu$ L enzim kasar dituang kedalam 50  $\mu$ L bufer 0.1 M dengan pH 4.5–8.5 (interval pH: 0.5). Campuran enzim dan bufer kemudian disimpan pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dan ditambah 1 mL bufer 0.1 M pada pH optimum. Stabilitas  $\beta$ -galaktosidase diberbagai suhu diuji dengan cara: sejumlah 100  $\mu$ L enzim kasar dituang kedalam 1 mL bufer 0.1 M pada pH optimum. Campuran enzim dan bufer kemudian disimpan selama 1 jam pada berbagai suhu (25–60°C dengan interval: 5°C) dan didinginkan. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kemudian diukur dengan metoda Lu *et al.*, 2009,<sup>(17)</sup> dengan inkubasi pada suhu optimum.

#### *Laktosa susu UHT yang tidak Terhidrolisa*

Laktosa susu UHT yang tidak terhidrolisa dideteksi dengan menggunakan kit enzimatik GOD-POD. Tahapan deteksi ini meliputi hidrolisis laktosa susu UHT, analisa laktosa susu UHT dan penghitungan jumlah laktosa susu UHT yang tidak terhidrolisis

$$\text{Kecepatan reaksi (k)} = \frac{2.303}{t} \log \frac{100}{100-x} \quad (2)$$

$x$  = laktosa yang tidak terhidrolisis

$$t_{1/2} = 0.693/k \quad (3)$$

$t_{1/2}$  = waktu yang diperlukan untuk menghidrolisa 50% laktosa

$k$  = konstanta kecepatan reaksi

#### *Hidrolisis Laktosa Susu UHT*

Sejumlah 4.8 U/mL  $\beta$ -galaktosidase hasil dialisis dituang kedalam susu UHT. Sampel diinkubasi pada suhu dan waktu inkubasi optimum. Kontrol adalah susu UHT tanpa penambahan  $\beta$ -galaktosidase atau didefinisikan sebagai perlakuan jam ke-0. Setiap jam (jam ke-0 sehingga jam ke-12) sejumlah 250  $\mu$ L sampel diambil, kemudian dianalisa glukosa dengan kit enzimatik GOD-POD.

#### *Analisa Laktosa Susu UHT*

Sebanyak 1 mL reagen GOD-POD diperlakukan pemanasan awal selama 5 menit pada 37 °C. Sejumlah 10  $\mu$ L sampel susu UHT (kontrol dan perlakuan  $\beta$ -galaktosidase) ditambahkan kedalam reagen GOD-POD dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Larutan dianalisa dengan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  505 nm. Absorban yang didapatkan dibandingkan dengan absorban standar glukosa 100 mg/dL. Jumlah glukosa yang terbentuk pada kondisi perlakuan didefinisikan dalam mg/dL kemudian diubah ke % (b/v).

#### *Jumlah Laktosa Susu UHT yang Tidak Terhidrolisa dengan Metoda Kishore and Kayastha (2012)<sup>(20)</sup>*

Jumlah laktosa yang tidak terhidrolisa dihitung berdasarkan jumlah glukosa tanpa perlakuan enzim dibagi jumlah glukosa dengan perlakuan enzim dikalikan 100 %

Korelasi grafik antara log % laktosa yang tidak terhidrolisa (y axis) dan waktu (x axis).

### Data Analisa

Data hasil penelitian dianalisa secara statistik menggunakan *analysis of variance* (ANOVA). Jika hasil analisa statistik didapatkan pengaruh yang signifikan ( $p < 0.05$ ), pengujian dilanjutkan dengan uji Duncan. Software yang digunakan adalah IBM SPSS Statistics 20.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi  $\beta$ -galaktosidase kasar dari bakteri *L. plantarum* B123 indigenos lebih tinggi dibandingkan dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12). Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. plantarum* B123 indigenos yang lebih tinggi (Tabel 1) dari aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12).<sup>(7)</sup> Enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 mempunyai kisaran suhu dan pH yang luas sehingga enzim ini dapat digunakan untuk aplikasi biokonverter laktosa untuk produk susu (Gambar 4-5). Enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 hasil dialisis sebesar 4.8 U/mL berpotensi menghidrolisa 50% laktosa susu UHT pada suhu 50°C selama 6.08 jam (Gambar 6-7).

### Produksi $\beta$ -galaktosidase *Lactobacillus plantarum* B123 dengan purifikasi parsial.

Purifikasi parsial  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 menghasilkan peningkatan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase dari 15.05 U/mg enzim kasar

menjadi 55.88 U/mg enzim hasil pengendapan dengan menggunakan amonium sulfat 60 %, dan selanjutnya meningkat menjadi 109.58 U/mg enzim hasil dialisis (Tabel 1).  $\beta$ -Galaktosidase kasar meningkat purifikasinya sebesar 3,71 kali setelah enzim diendapkan dengan amonium sulfat 60 %, dan meningkat lagi sebesar 7,28 kali setelah enzim didialisis (Tabel 1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan purifikasi parsial, aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 mengalami peningkatan.

Enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 yang dipurifikasi parsial diproduksi melalui beberapa tahapan mulai dari ekstraksi enzim untuk menghasilkan enzim kasar, pengendapan dengan amonium sulfat, dan dialisis. Enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 adalah enzim intraselluler, sehingga dalam proses produksi diperlukan sonikasi untuk pemecahan dinding sel. Pengendapan terjadi karena kompetisi antara garam dan protein untuk pengikatan air<sup>(21)</sup>. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi dialisis adalah pelarut, suhu, tekanan atau perubahan yang terjadi dalam membran.<sup>(22)</sup> Ukuran membran dialisis selofan yang digunakan adalah 6-8 kDa MWCO, sehingga molekul-molekul lain yang mempunyai ukuran kurang dari 6-8 kDa keluar dari membran semi-permeabel. Enzim  $\beta$ -galaktosidase dari beberapa strains *Lactobacillus* mempunyai BM: 116 kDa.<sup>(23)</sup> Enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* membentuk mono dan dimer dengan perkiraan BM: 107 dan 214 kDa.<sup>(24)</sup>

**Tabel 1.** Total protein, aktivitas dan *yield*  $\beta$ -galaktosidase dari *Lb. plantarum* B123 indigenos

Tahapan	Total protein (mg)	Aktivitas (U)	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Purifikasi (fold)	Yield (%)
Enzim kasar (crude enzyme)	171.45 $\pm$ 7.36	2581.18 $\pm$ 27.86	21.51 $\pm$ 0.23	15.05	1	100
Pengendapan dengan amonium sulfat 60%	15.56 $\pm$ 2.15	869.3 $\pm$ 17.44	173.86 $\pm$ 3.49	55.88	3.71	33.68
Dialisis	3.30 $\pm$ 0.24	361.54 $\pm$ 1.92	106.34 $\pm$ 0.56	109.58	7.28	14.01

Nilai dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi dari 3 ulangan

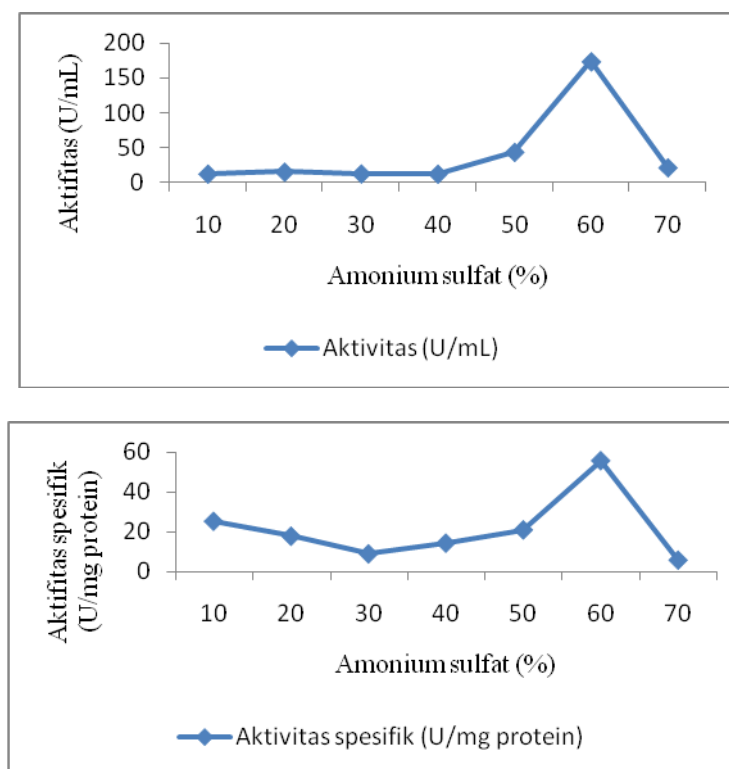
Hasil pengendapan dengan amonium sulfat menunjukkan bahwa aktivitas optimum ( $173.86 \pm 3.49$  U/mL) dan aktivitas spesifik optimum (55.88 U/mg protein) dihasilkan pada konsentrasi amonium sulfat 60 % (Gambar 1). Secara statistik, konsentrasi amonium sulfat berpengaruh nyata terhadap aktivitas dan

Hasil pengendapan dengan amonium sulfat menunjukkan bahwa aktivitas optimum ( $173.86 \pm 3.49$  U/mL) dan aktivitas spesifik optimum (55.88 U/mg protein) dihasilkan pada konsentrasi amonium sulfat 60 % (Gambar 1). Secara statistik, konsentrasi amonium sulfat berpengaruh nyata terhadap aktivitas dan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase ( $p < 0.05$ ). Akibatnya, pengendapan amonium sulfat yang digunakan adalah pada konsentrasi 60 %

Gambar 1. menunjukkan bahwa konsentrasi amonium sulfat berpengaruh terhadap aktivitas dan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123. Semakin

meningkat konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan, semakin meningkat aktivitas dan aktivitas spesifik enzim dan aktivitas optimum tercapai pada konsentrasi amonium sulfat 60 %. Hal ini disebabkan karena semakin meningkat konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan, semakin meningkat kelarutan protein, dan sampai pada konsentrasi tertentu kelarutan protein menurun. Konsentrasi amonium sulfat yang optimum ini sekaligus menurunkan aktivitas enzim, karena sebagian protein mengalami denaturasi dan rusak selama pengendapan.<sup>(19)</sup>

Yield yang dihasilkan setelah dialisis sebesar 14.01 % menunjukkan bahwa dialisis pada  $\beta$ -galaktosidase dari *Lb. plantarum* B123 indigenos kasar adalah efektif dan efisien (Tabel 1). Hal ini dikarenakan kemurnian  $\beta$ -galaktosidase meningkat dari 1 fold ( $\beta$ -galaktosidase kasar) menjadi 7.28 fold ( $\beta$ -galaktosidase hasil dialisis).



**Gambar 1.** Aktivitas (a) dan aktivitas spesifik (b)  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *Lb. plantarum* B123 indigenos diberbagai konsentrasi amonium sulfat

Selain itu dari Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase meningkat dari 15,05 U/mg ( $\beta$ -galaktosidase kasar) menjadi 109,58 U/mg ( $\beta$ -galaktosidase hasil dialisis).

Produksi  $\beta$ -galaktosidase dari beberapa mikroorganisme menunjukkan bahwa perbedaan jenis mikroorganisme penghasil  $\beta$ -galaktosidase dan jenis purifikasi mempengaruhi aktivitas dan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase. Purifikasi lebih lanjut, menggunakan kromatografi gel filtrasi menghasilkan aktivitas lebih tinggi, seperti  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan dari

*Thermotoga maritima* yang menghasilkan aktivitas sebesar 185 U/mg.<sup>(8)</sup> Enzim  $\beta$ -galaktosidase kasar yang diekstraksi dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12) menghasilkan aktivitas sebesar 20.9 U/mL.<sup>(7)</sup> Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12) lebih rendah dibandingkan aktivitas  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkan dari *L. plantarum* B123 indigenos yang mempunyai aktivitas sebesar  $21.51 \pm 0.23$  U/mL atau 15.05 U/mg (enzim kasar) dan 109.58 U/mg protein (enzim hasil dialisis), dimana purifikasi dilakukan hanya sampai pada tahapan dialisis. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. plantarum* B123 indigenos ( $21.51 \pm 0.23$  U/mL) yang lebih tinggi dari aktivitas  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12) (20.9 U/mL) menunjukkan bahwa *L. plantarum* B123 indigenos merupakan bakteri asam laktat lokal penghasil  $\beta$ -galaktosidase yang produksi enzim kasarnya (U/mL) lebih tinggi dibandingkan dari *L. bulgarian ssp.* (CHR Hansen Lb-12).

#### **Karakteristik $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123**

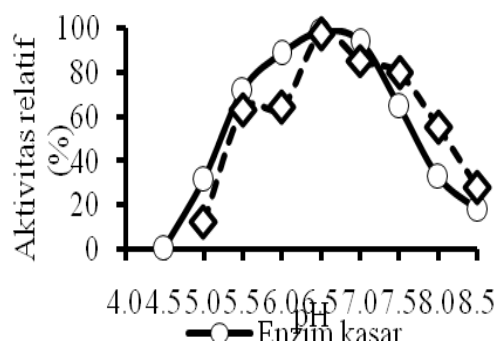
Karakteristik  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 yang dideteksi meliputi

optimasi pH dan suhu  $\beta$ -galaktosidase kasar dan hasil dialisis, beserta stabilitas pH dan suhu  $\beta$ -galaktosidase kasar.

Optimasi pH dilakukan dengan mendeteksi aktivitas relatif  $\beta$ -galaktosidase masing-masing diberbagai pH antara pH 4,5-8,5, dan aktivitas optimum  $\beta$ -galaktosidase terjadi pada pH dengan aktivitas relatif tertinggi. Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase diberbagai pH (Gambar 2) menunjukkan bahwa pH optimum  $\beta$ -galaktosidase enzim kasar dan hasil dialisis dari *L. plantarum* B123 dalam menghidrolisa substrat oNPG adalah 6.5. Secara statistik, nilai pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas  $\beta$ -galaktosidase ( $p < 0.05$ ). Nilai pH optimum  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* WCFS1 dengan substrat oNPG adalah 7.5,<sup>(12)</sup> sedangkan pH optimum  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* adalah 6,8.<sup>(24)</sup> Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan jenis bakteri mengakibatkan perbedaan pH optimum  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkannya. Dilaporkan bahwa karakteristik  $\beta$ -galaktosidase dari jenis bakteri yang berbeda berpengaruh terhadap interaksinya dengan molekul substrat yang mengakibatkan terjadinya perbedaan pH optimum enzim yang dihasilkannya.<sup>(12,24)</sup>

Gambar 2 menunjukkan  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 mempunyai aktivitas tertinggi pada pH 6.5 dengan aktivitas relatif sebesar 97,38 %. Selanjutnya aktivitas  $\beta$ -galaktosidase menurun seiring dengan peningkatan pH. Menurunnya aktivitas enzim karena perubahan pH larutan yang tidak terlalu besar (sedikit dibawah atau diatas pH optimalnya) disebabkan oleh berubahnya keadaan ion enzim dan seringkali juga keadaan ion substrat. Pada pH tertentu terjadi denaturasi enzim yang mengakibatkan turunnya aktivitas enzim secara bertahap.<sup>(25)</sup>



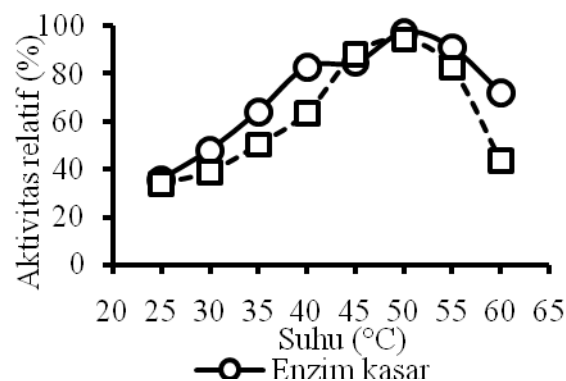


**Gambar 2.** Aktivitas relatif  $\beta$ -galaktosidase dari *Lb. plantarum* B123 indigenos pada berbagai pH

Aktivitas  $\beta$ -galaktosidase diberbagai suhu (Gambar 3) menunjukkan bahwa suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase enzim kasar dan hasil dialisis dari *L. plantarum* B123 dalam menghidrolisa substrat *o*NPG adalah 50 °C. Secara statistik, nilai suhu berpengaruh nyata terhadap aktivitas  $\beta$ -galaktosidase ( $p < 0.05$ ). Nilai suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* WCFS1 dengan substrat *o*NPG adalah 55 °C,<sup>(12)</sup> sedangkan suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* 56 °C<sup>(24)</sup>. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan jenis bakteri mengakibatkan perbedaan suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase yang dihasilkannya. Dilaporkan bahwa karakteristik  $\beta$ -galaktosidase dari jenis bakteri yang berbeda berpengaruh terhadap interaksinya dengan molekul substrat yang mengakibatkan terjadinya perbedaan suhu optimum enzim yang dihasilkannya.<sup>(12,24)</sup>

Gambar 3 menunjukan aktivitas relatif  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 meningkat hingga suhu 50°C. Enzim  $\beta$ -galaktosidase pada suhu 50°C menunjukkan aktivitas relatif tertinggi dengan nilai 94,42 %, dan aktivitasnya akan menurun pada suhu 55 °C. Sebelum suhu optimum, aktivitas enzim meningkat karena terjadi peningkatan energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, serta rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk saling bertumbukan. Suhu yang lebih besar dari suhu optimum menyebabkan protein

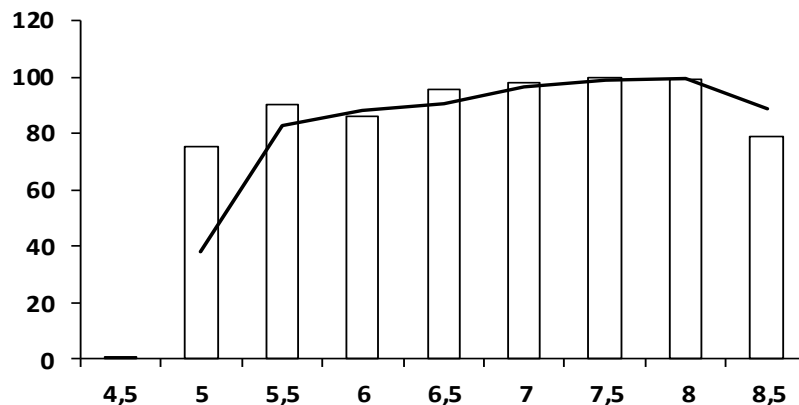
enzim mengalami perubahan konformasi yang menyebabkan aktivitasnya berkurang. Substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga sisi reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim pada suhu tinggi.<sup>(25,26)</sup>



**Gambar 3.** Aktivitas relatif  $\beta$ -galaktosidase dari *Lb. plantarum* B123 indigenos pada berbagai suhu

Stabilitas  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 dilakukan dengan inkubasi enzim selama 1 jam diberbagai pH dan suhu, kemudian direaksikan dengan substrat *o*NPG untuk menghasilkan berbagai aktivitas enzim. Kestabilan enzim berhubungan dengan ketahanan enzim dalam mempertahankan konformasinya terhadap kondisi lingkungan sehingga tidak mengubah kedudukan sisi aktif.<sup>(26)</sup>

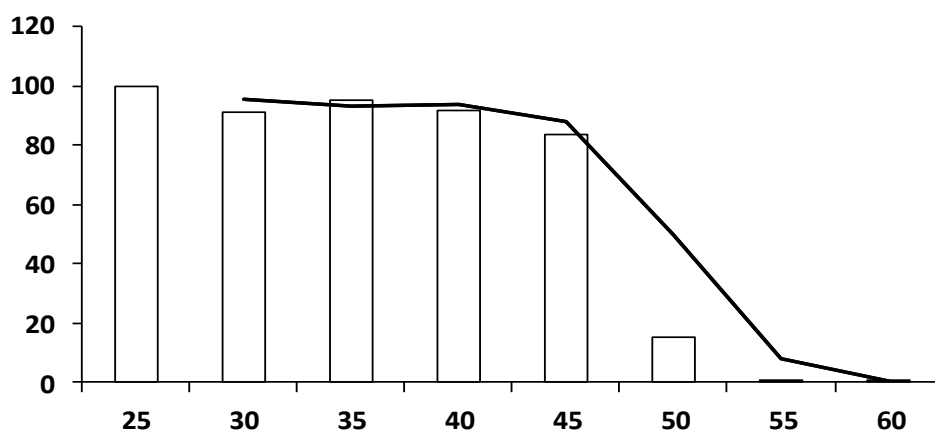
Stabilitas enzim kasar  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 yang diinkubasi selama 1 jam terjadi pada pH: 5.0-8.5 (Gambar 4). Nilai pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim ( $p < 0.05$ ). Gambar 4 menunjukan pengaruh pH terhadap aktivitas relatif  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123. Enzim  $\beta$ -galaktosidase relatif stabil setelah diinkubasikan selama 1 jam pada kisaran pH 5,5-8,5 karena masih menyisakan aktivitasnya diatas 50%. Sebagai perbandingan, stabilitas  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* WCFS1 terjadi pada pH 6.5-8.0.<sup>(12)</sup> Enzim  $\beta$ -galaktosidase dari *Streptococcus thermophilus* LMD9 stabil pada kisaran pH 6,5-7,5,<sup>(27)</sup> dan *Kluyveromyces lactis*



**Gambar 4.** Aktivitas relatif (%)  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. plantarum* B123 indigenos yang diinkubasi selama 1 jam pada berbagai pH

berkisar pada pH 7,0.<sup>(28)</sup> Szczodiak<sup>(29)</sup> menyatakan  $\beta$ -galaktosidase yang dapat digunakan untuk biokonverter laktosa pada susu harus dapat aktif pada pH 6,7-6,8 dan biokonverter pada whey dapat aktif pada pH 5,5-6,0. Berdasarkan penelitian ini,  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 mempunyai kisaran pH yang luas sehingga enzim ini dapat digunakan untuk aplikasi biokonverter laktosa untuk produk susu.

Stabilitas  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 juga dilakukan dengan inkubasi enzim selama 1 jam diberbagai suhu, kemudian direaksikan dengan substrat oNPG untuk menghasilkan berbagai aktivitas enzim. Stabilitas enzim kasar  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 yang diinkubasi selama 1 jam terjadi pada suhu: 25-50°C (Gambar 5). Nilai suhu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim ( $p < 0.05$ ).

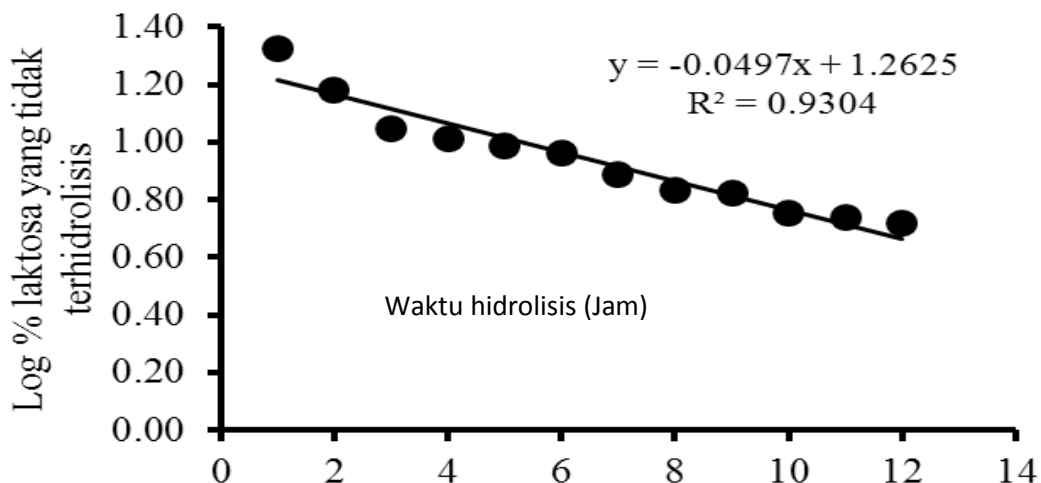


**Gambar 5.** Aktivitas relatif (%)  $\beta$ -galaktosidase kasar dari *L. plantarum* B123 indigenos yang diinkubasi selama 1 jam pada berbagai suhu

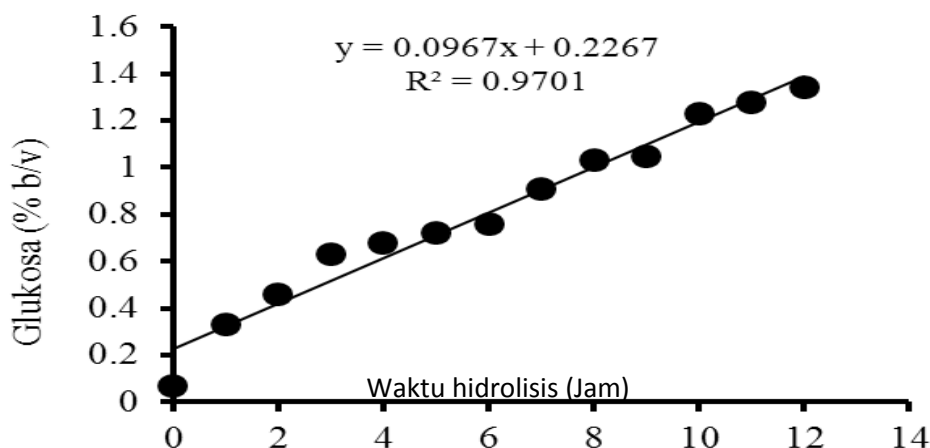
Kestabilan enzim terhadap panas dapat terjadi karena pelipatan asam amino penyusun protein membentuk konformasi tertentu yang tahan terhadap efek denaturasi akibat panas. Gambar 5 menunjukkan pengaruh suhu terhadap aktivitas relatif  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123. Enzim  $\beta$ -galaktosidase relatif stabil setelah diinkubasikan selama 1 jam pada kisaran suhu 25-45 °C karena masih menyisakan aktivitasnya diatas 50 %. Peningkatan suhu meningkatkan kecepatan reaksi sampai batas optimum. Hal ini disebabkan pada kisaran suhu tersebut aktivitas  $\beta$ -galaktosidase masih dapat menyisakan aktivitasnya diatas 50 %. Selanjutnya mengalami penurunan pada suhu 50 °C dengan menyisakan 15,22 % dari aktivitasnya. Penurunan aktivitas pada enzim pada suhu 50 °C terlalu signifikan karena protein enzim terdenaturasi akibat peningkatan suhu.<sup>(30)</sup> Sebagai perbandingan, suhu optimum  $\beta$ -galaktosidase *E. cloacae* B5 sekitar 35 °C dan enzim ini stabil pada suhu dibawah 30 °C.<sup>(31)</sup> Berdasarkan penelitian ini,  $\beta$ -galaktosidase dari *L. plantarum* B123 mempunyai kisaran suhu yang luas

sehingga enzim ini dapat digunakan untuk aplikasi biokonverter laktosa untuk produk susu.

Penambahan substrat *o*NPG dalam uji stabilitas dilakukan pada enzim kasar  $\beta$ -galaktosidase dan diinkubasi selama 1 jam diberbagai pH dan suhu.  $\beta$ -Galaktosidase adalah enzim yang mempunyai karakteristik induktif, aktivitasnya bergantung substrat pada awal reaksi, sehingga hal ini menyebabkan penurunan aktivitas pada suhu: 50 °C (Gambar 5). Kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim sangat dipengaruhi oleh berbagai konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi awal apabila konsentrasi enzim dijaga konstan. Konsentrasi substrat yang amat rendah menyebabkan kecepatan reaksi amat rendah tetapi kecepatan akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Pada akhirnya, akan tercapai titik batas, dan setelah titik ini dilampaui, kecepatan reaksi hanya akan meningkat sedemikian kecil dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Pada batas ini, enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat.<sup>26</sup>



**Gambar 6.** Log % laktosa yang tidak terhidrolisis susu UHT dengan penambahan  $\beta$ -galaktosidase diberbagai waktu hidrolisis



**Gambar 7.** Kandungan glukosa susu *UHT* dengan penambahan  $\beta$ -galaktosidase diberbagai waktu hidrolisis

#### ***Hidrolisis laktosa pada susu UHT dengan kit enzimatik GOD-POD***

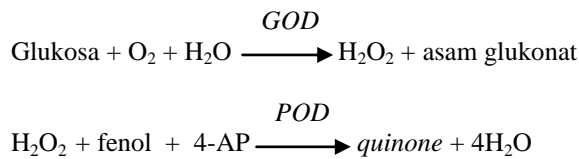
Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah laktosa yang tidak terhidrolisis menurun (Gambar 6). Gambar 6 menunjukkan persamaan garis linier dengan nilai  $R^2 = 0.9304$ , *slope* dengan nilai negatif menunjukkan adanya penurunan laktosa yang tidak terhidrolisa selama waktu hidrolisis (jam). Dari persamaan garis ini didapatkan  $k$  (konstanta kecepatan reaksi hidrolisis) sebesar 0.114 /jam, dan  $t_{1/2}$  (prediksi waktu yang diperlukan untuk menghidrolisa 50 % laktosa dalam susu *UHT* dengan penambahan 4.8 U/mL konsentrasi enzim pada suhu 50 °C) adalah 6.08 jam.

Gambar 7 menunjukkan semakin tinggi waktu hidrolisis, semakin tinggi konsentrasi glukosa dengan persamaan garis linier ( $R^2=0.9701$ ). *Slope* dengan nilai positif menunjukkan peningkatan glukosa selama waktu hidrolisis (jam). Hal ini menunjukkan bahwa  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 dapat menghidrolisa laktosa pada susu *UHT* menjadi glukosa dan galaktosa.  $\beta$ -Galaktosidase yang dihasilkan dari mikroorganisme yang berbeda mempunyai karakteristik yang berbeda, diantaranya: berat molekul, rantai panjang protein, dan posisi sisi aktif.<sup>(32)</sup>  $\beta$ -Galaktosidase yang dihasilkan dari *L.*

*plantarum* mempunyai donor proton Glu<sup>461</sup> dan basa nukleofilik Glu<sup>537</sup>.<sup>(24)</sup> Proton donor dan nukleofilik spesifik dari  $\beta$ -galaktosidase mempunyai peranan dalam hidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa.<sup>(33)</sup> Mekanisme katalitik  $\beta$ -galaktosidase adalah laktosa membentuk intermediet dengan nukleofil Glu 537 dan dibantu dengan asam (A: Glu 461 atau ion Magnesium). Selanjutnya Glu 461 mendonorkan proton dengan memberikan  $H^+$  pada oksigen glikosidik yang disertai pemutusan ikatan glikosidik dan pelepasan glukosa. Langkah kedua adalah pembentukan intermediet *transient triangular oxocarbenium* yang dibantu oleh basa (B: Glu 461) lalu terjadi protonasi dari Glu 461 yang dikatalisis air dan diakhiri dengan transfer galaktosil ke air atau gula lain. Jika akseptor berupa air maka akan terjadi proses hidrolisis sehingga terbentuk glukosa dan galaktosa.<sup>(34)</sup>

Kit enzimatik GOD-POD digunakan untuk determinasi peningkatan glukosa selama proses hidrolisis laktosa pada susu *UHT* pada 50 °C selama 12 jam dengan interval waktu 1 jam.  $\beta$ -Galactosidase hasil dialisis yang ditambahkan adalah 4.8 U/mL susu. Kit GOD-POD adalah metoda uji glukosa secara enzimatik dan kolorimetrik. Prinsip uji ini adalah sebagai berikut (*Cypress Diagnostics*):

## DAFTAR PUSTAKA



Glukosa dioksidasi dengan *glucose-oxidase* (GOD) menjadi asam glukonat dan hidrogen peroksida. Pembentukan hidrogen peroksida dideteksi dengan aseptor *phenol-aminophenazone chromogenic oxygen* dengan bantuan *peroxidase* (POD) untuk menghasilkan senyawa *quinone* yang memberikan warna merah pada sampel, dan pengukuran dilakukan pada  $\lambda$  505 nm. Semakin tinggi konsentrasi glukosa dalam sampel, semakin tinggi intensitas warna merah.

## KESIMPULAN

Produksi  $\beta$ -galaktosidase *L.plantarum* B123 dengan purifikasi parsial/ hasil dialisis mengalami peningkatan. Kemurnian dan aktivitas spesifik  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 mengalami peningkatan setelah  $\beta$ -galaktosidase didialisis. Enzim  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 hasil dialisis sebesar 4.8 U/mL dapat menghidrolisa 50 % laktosa susu UHT pada suhu 50 °C selama 6.08 jam. Disimpulkan bahwa  $\beta$ -galaktosidase *L. plantarum* B123 indigenos yang dipurifikasi secara parsial dapat digunakan sebagai penghidrolisa laktosa dalam memproduksi susu UHT rendah laktosa.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh proyek PKPP-RISTEK DIKTI 2012 dan DIPATEMATIK 2013, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Neneng Karimayati atas bantuan teknis selama penelitian.

1. P. Walstra, J.T.M. Wouters, T.J. Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology*, 2end. ed. CRC Press-Taylor & Francis Group, USA, 2006.
2. M. Montalto, V. Curigliano, L. Santoro, M. Vastola, G. Cammarota, R. Manna, A. Gasbarrini, G. Gasbarrini. Management and treatment of lactose malabsorption. *World Journal of Gastroenterology*. 12: 187-191 (2006).
3. P.S. Panesar, S. Kumari, R. Panesar. 2010. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. Review Article. *Enzyme Research*. 1-16 (2010).
4. P. Karasova, V. Spiwok, S. Mala, B. Kralova, and N.J. Beta-galactosidase activity in psychrotrophic microorganism and their potential use in food industry. *Czech J Food Sci*. 20 (2): 43-47 (2002).
5. C. Schwab, K.I. Sørensen, M.G. Ganzle. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42  $\beta$ -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis*. *Systematic and Applied Microbiology*. 33: 300-307 (2010).
6. E. Jurado, F. Camacho, G. Luzon, J.M. Vicaria. *Enzyme and Microbial Technology*. 31:300-309 (2002).
7. A. Jokar, A. Karbassi. In-house production of lactose-hydrolysed milk by  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *J Agr Sci Tech*. 13:577-584 (2011).
8. P. Katrolia, M. Zhang, Q. Yan, Z. Jiang, C. Song, L. Li. Characterization of thermostable family 42  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ galC) family from *Thermotoga maritima* showing efficient lactose hydrolysis. *Food Chem*. 125: 614-621 (2011).

9. S. Erich, T. Anzmann, L. Fischer. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. *Food Chem.* 135: 2393-2396 (2012).
10. A.I.R. Matute, M.C. Martinez, A. Montilla, A. Olano, P. Copovi, N. Corzo. Presence of mono-di-and galacto-oligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis.* 28: 164-169 (2012).
11. E. Gheyntachi, F. Heshmati, B.K. Shargh, J. Nowroozi, F. Movahedzadeh. Study on  $\beta$ -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research.* 4(6):454-458 (2010).
12. S. Iqbal, T.H. Nguyen, T.T. Nguyen, T. Maischberger, D. Haltrich.  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research.* 345:1408-1416 (2010).
13. P. Katrolia, M. Zhang, Q. Yan, Z. Jiang, C. Song, L. Li . 2011. Characterisation of thermostable family 42  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ galC) family from *Thermotoga maritima* showing efficient lactose hydrolysis. *Food Chem.* 125: 614-621.
14. S. Erich, T. Anzmann, L. Fischer L. 2012. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. *Food Chem.* 135: 2393-2396.
15. J.M. Jay, M.J. Loessner, D.A. Golden. *Modern Food Microbiology.* 7<sup>th</sup> Edition. USA: Springer Science and Business Media Inc, USA, (2005).
16. D. Wang, M. Sakakibara. Lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strain. *Ultrasonics Sonochem.* 4: 255-261 (1997).
17. L.L. Lu, M. Xiao, Y.M. Li, F.S. Wang. A novel transglycosylating  $\beta$ -galactosidase from *Enterobacter cloacae* B5. *Process Biochem.* 44: 232-236 (2009).
18. M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254 (1976).
19. R.K. Scopes. *Protein Purification.* RR Doneley and Sons, New York, 1993.
20. D. Kishore, M. Kayastha. A  $\beta$ -galactosidase from chick pea (*Cicer arietinum*) seeds: Its purification, biochemical properties and industrial application. *Food Chem.* 134: 1113-1122 (2012).
21. E.I. Fatchiyah, S. Arumingtyas, S. Widyarti, Rahayu. *Molecular Biology. Analysis Basic.* Penerbit Erlangga, Jakarta(ID), 2011. (in Indonesian).
22. M. Bintang. *Biochemistry: Research Technique.* Penerbit Erlangga, Jakarta (ID), 2011. (in Indonesian).
23. E. Gheyntachi, F. Heshmati, B.K. Shargh, J. Nowroozi, F. Movahedzadeh. Study on  $\beta$ -galactosidase enzyme produced by isolated Lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research.* 4:454-458 (2010).
24. C. Schwab, K.I. Sørensen, M.G. Ganzle. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42  $\beta$ -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis*. *Systematic and Applied Microbiology.* 33: 300-307 (2010).
25. T. Palmer *Understanding Enzymes.* 3<sup>th</sup> Ed. Ellis Horwood, New York, 1991.

26. A.L. Lehninger. *Principles of Biochemistry*. Elsevier Science, Amhrest, 2004.
27. M. Rhimi *et al.* Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a  $\beta$ -galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Res in Microbiol* 161: 515-525 (2010).
28. CS. Kim, ES Ji, D.K. Oh. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 25: 1769-1774 (2003).
29. J. Szczodrak. 2000. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J Mol Catal B Enzymatic*. 10: 631-637, (2000).
30. W. Aehle. *Enzyme in industry. Production and Application*. 3<sup>rd</sup> completely revised ed. Verlag Gmbh & Co.KGaA, Wiley-VCH, 2007.
31. L.L. Lu, M. Xiao, ZY Li, Y.M. Li, F.S. Wang. 2009. A novel transglycosylating  $\beta$ -galactosidase from *Enterobacter cloacae* B5. *Process Biochem*. 44: 232-236 (2009).
32. J.M. Jay, M.J. Loessner, D.A. Golden. *Modern Food Microbiology*. 7<sup>th</sup> ed. Springer Science & Business Media Inc., USA, 2005.
33. T.J. Britz, R.K. Robinson. *Advanced Dairy Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd., UK, 2008.
34. B.W. Matthews. The structure of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase. *CR Biologies*. 328: 529-556, (2005).

